

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Rec'd PCT/PTO 18 FEB 2005

REC'D 10 DEC 2004



WIRG PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000054755	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09101	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18.08.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 20.08.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Anmelder SUNGENE GMBH & CO. KGAA et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheids
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  23.01.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  07.12.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt - Gitschiner Str. 103 D-10958 Berlin Tel. +49 30 25901 - 0 Fax: +49 30 25901 - 840	Bevollmächtigter Bediensteter  Schönwasser, D Tel. +49 30 25901-318 

**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

**Beschreibung, Seiten**

1-79 in der ursprünglich eingereichten Fassung

**Sequenzen, Seiten**

1-42 in der ursprünglich eingereichten Fassung

**Ansprüche, Nr.**

1-43 in der ursprünglich eingereichten Fassung

**Zeichnungen, Blätter**

1/11-11/11 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung,      Seiten:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/09101

- ☐ Ansprüche, Nr.:  
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.  
☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.  
☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.  
☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist.  
☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:

**siehe Beiblatt**

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.  
☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 1. Feststellung                |   |
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche -<br>Nein: Ansprüche 1-43   |
| Erfinderische Tätigkeit (IS)   | Ja: Ansprüche -<br>Nein: Ansprüche 1-43   |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-43<br>Nein: Ansprüche: - |

2. Unterlagen und Erklärungen:

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt IV**

**Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (Art. 34(3)(a), PCT)**

Die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde schließt sich der Meinung der International Recherchenbehörde in bezug auf das Fehlen der Einheitlichkeit der Erfindungen wie im Formblatt PCT/ISA/206 dargelegt an. Es kann jedoch im vorliegenden Fall ein schriftlicher Bescheid für sämtliche Erfindungen ohne wesentlichen Mehraufwand erstellt werden. **Diese Einschätzung betrifft jedoch lediglich die Erstellung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts und ist in keiner Weise bindend für die eventuelle Prüfung in einer nationalen bzw. regionalen Phase.**

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Die Dokumente D1 und D2 wurden im internationalen Recherchenbericht nicht angegeben.

D1: WO99/55887 A (E.I. DU PONT DU NEMOURS AND COMPANY (US)) 04.  
November 1999 (1999-11-04)

D2: WO0008920 A (YISSUM RES DEV CO (IL)) 24. Februar 2000 (2000-02-24)

Außerdem wird auf die folgenden, im internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente verwiesen:

D3: WO 01/88169 A (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 22. November 2001  
(2001-11-22)

D4: WO 00/32788 A (HANSENS LAB) 8. Juni 2000 (2000-06-08)

D5: DHARMAPURI S ET AL: "Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 519, Nr. 1-3, 22. Mai 2002 (2002-05-22), Seiten 30-34, XP004356816 ISSN: 0014-5793

**1. Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Art. 33(2)(3), PCT)**

- 1.1** Es wird darauf hingewiesen, daß die im Recherchenbericht als PX- Dokument bezeichnete Literatur für die Bewertung der Neuheit und der erfinderischen Tätigkeit der geltenden Ansprüche **nicht** in Betracht gezogen wurde, da davon ausgegangen wurde, daß die Priorität der vorliegenden Anmeldung gültig ist und eine Überprüfung der Gültigkeit von Prioritäten der im Internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente gemäß Amtsblatt EPA, 11/2001, Seiten 539-542, besonders Abschnitt 13 zum jetzigen Zeitpunkt nicht durchgeführt wird.
- 1.2** Die Anmeldung betrifft Verfahren zur Herstellung von  $\beta$ -Carotinoiden durch Kultivierung gentechnisch veränderter Pflanzen, sowie die Verwendung dieser Pflanzen und eines daraus hergestellten Extraktes. Die Verfahren beruhen auf der Überexpression von  $\beta$ -Cyclase, gegebenenfalls in Kombination mit der Überexpression einer Hydroxylase bzw. der Suppression von  $\epsilon$ -Cyclase und/oder  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität durch Verwendung entsprechender antisense-, Ribozym- oder Kosuppressionskonstrukte.
- 1.3** D1 offenbart u.a. die Verwendung von  $\beta$ -Cyclase,  $\beta$ -Hydroxylase und  $\epsilon$ -Cyclase zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit verändertem  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Carotinoidgehalt (Fig. 1-3, Seite 12, Zeile 26-Seite 14, Zeile 2). Die Aktivität der betreffenden Enzyme kann dabei durch Überexpression, bevorzugt unter der Kontrolle des Endosperm-spezifischen Promotors Zein, bzw. Inhibierung durch Kosuppression oder antisense RNA moduliert werden. Die Inhibierung der Aktivitäten von  $\beta$ -Hydroxylase und  $\epsilon$ -Cyclase zur vermehrten Herstellung von  $\beta$ -Carotinoiden bzw. dem  $\beta$ -Carotinoid Zeaxanthin ist dabei besonders hervorgehoben (Seite 12, Zeilen 31-39). Die Verwendung von derartig manipulierten Pflanzen als Nahrungs- und Futtermittel, bzw. zur Pigmentierung von Tierprodukten ist ebenfalls erwähnt. Die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase aus D1 (SEQ ID NO:12) weist eine Sequenzidentität von 66,1 % zu der  $\beta$ -Cyclasesequenz (SEQ ID NO:2) der vorliegenden Anmeldung auf. Somit ist der Gegenstand der gegenwärtigen Ansprüche 1-3, 5-24, 29-36, 41-43 nicht neu (Art. 33(2), PCT). Weiterhin ist der Gegenstand der Ansprüche 4, 25-28, 37-40 nicht erfinderisch im Sinne von Art. 33(2)(3), PCT, da die Verwendung einer anderen bekannten  $\beta$ -Cyclase (siehe z.B. D2) lediglich eine dem Fachmann geläufige Variante der an sich bekannten Verfahren darstellt (analoge Substitution). Ebenso ist die Anwendung der Verfahren in verschiedenen Mitgliedern diverser Pflanzenfamilien dem Fachmann geläufig und daher nicht erfinderisch.

**1.4** D2 offenbart eine  $\beta$ -Cyclase Aminosäuresequenz aus *Lycopersicon esculentum* (siehe SEQ ID NO:17 und 18, welche beide eine Sequenzidentität von 100% zu der in SEQ ID NO:2 dargestellten  $\beta$ -Cyclase Sequenz der Anmeldung aufweisen) und ihre Verwendung zur Herstellung transgener Pflanzen, die einen erhöhten Gehalt an  $\beta$ -Carotinoiden, besonders in chromogenen Geweben wie Früchten und Blüten, aufweisen (Seite 4, Zeilen 1-6; Seite 7, Zeilen 5-7).

Somit mangelt es dem Gegenstand der Ansprüche 1-7,23-32,36,37 und 39 an Neuheit und den Ansprüchen 38 und 40 an erfinderischer Tätigkeit (Art.33(2)(3), PCT), da wie unter Punkt 2.3 ausgeführt, die Ausführung dieser Verfahren in verschiedenen Pflanzen dem Fachmann geläufig ist.

**1.5** D3 offenbart u.a. Verfahren zur Herstellung von  $\beta$ -Carotinoiden in Pflanzen durch Überexpression von  $\beta$ -Cyclase oder Inhibition von  $\epsilon$ -Cyclase durch Expression von antisense DNA in photosynthetisch nicht aktiven Geweben (Seite 13, Zeile 24-Seite 14, Zeile 5; Seite 3, Zeilen 18-20). Weiterhin wird in D3 eine Erhöhung der  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität zur Herstellung des  $\beta$ -Carotinoids Zeaxanthin beschrieben. Da die in D3 offenbarte  $\beta$ -Cyclase aus *Brassica napus* eine Sequenzidentität von 51.9% zu SEQ ID NO:2 der vorliegenden Anmeldung aufweist, sind die vorliegenden Verfahrensansprüche sowie die auf genetisch veränderte Pflanzen gerichteten Ansprüche zwar als neu anzusehen, jedoch mangelt es den Ansprüchen 1-40 an erfinderischer Tätigkeit im Sinne von Art. 33(3), da der Fachmann allgemein davon ausgeht, daß die heterologe Expression eines Enzyms mit vergleichbarer Aktivität einen gleichwertigen Effekt erzielt und Enzyme gleicher Spezifität im Bedarfsfall ausgetauscht werden können. Weiterhin sind die Verwendungen derartiger gentechnisch veränderter Pflanzen als Futter- und Nahrungsmittel sowie die Verwendung dieser Extrakte gemäß der Ansprüche 41-42 nicht erfinderisch im Hinblick auf Informationen auf Seite 3, Zeile 24-Seite 5, Zeile 3; Seite 11, Zeile 16- Seite 12, Zeile 2.

**1.6** D4 offenbart Verfahren zur Herstellung verschiedener Carotinoide durch Überexpression bzw. Suppression der Gene, die u.a. für  $\beta$ -Cyclase,  $\epsilon$ -Cyclase und  $\beta$ -Hydroxylase kodieren (Seite 5, Zeile 27-Seite 6, Zeile 24). Die Herstellung eines spezifischen Carotinoids wird dabei durch die Überexpression bzw. Suppression eines einzigen dieser Gene oder einer Kombination mehrerer Gene gesteuert (Seite 6, Zeilen 19-24). Zur Herstellung von  $\beta$ -Carotinoiden ist besonders die Überexpression von  $\beta$ -Cyclase auf Seite 20, Zeilen 14-18, sowie die Suppression von  $\epsilon$ -Cyclase und  $\beta$ -Hydroxylase auf Seite 8, Zeilen 32-34 und Seite 17, Zeilen 21-28 hervorgehoben. Die gleichzeitige Überexpression von  $\beta$ -Cyclase und einer

Hydroxylase ist ebenfalls erwähnt (Seite 20, Zeilen 20-25). Außerdem wird auf die Verwendung von transgenen Blüten zur Herstellung von Futter- und Nahrungsmitteln hingewiesen (Seite 12, Zeile 16- Seite 13, Zeile 2). Da die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen  $\beta$ -Cyclase eine Sequenzidentität von 49% zu der entsprechenden Sequenz aus D4 aufweist, sind die vorliegenden Ansprüche 1-43 in bezug auf D4 zwar neu im Sinne von Art. 33(2), PCT, jedoch können die Ansprüche 1-42 nicht als erfinderisch gemäß Art. 33(3), PCT anerkannt werden.

- 1.7 D5 beschreibt die Überexpression von  $\beta$ -Cyclase alleine oder in Kombination mit  $\beta$ -Hydroxylase unter der Kontrolle eines Frucht-spezifischen Promotors (pds-Promotor) in Tomatenpflanzen. Die verwendete  $\beta$ -Cyclase (aus Arabidopsis) hat eine Identität von 51,2 % zu der in SEQ ID NO:2 definierten  $\beta$ -Cyclasesequenz der vorliegenden Anmeldung.
- Somit ist der Gegenstand der Ansprüche 1-43 formal neu im Hinblick auf D5, jedoch kann der Gegenstand der Ansprüche 1-14, 23-34 und 36-42 nicht als erfinderisch betrachtet werden, da die Überexpression äquivalenter Enzyme zur Erzielung des gleichen Effekts bereits in D5 offenbart wird.

## 2. Weitere Bemerkungen

- 2.1 Ansprüche 11 und 12 beziehen sich auf Verfahren zur Expression einer Hydroxylase, die durch eine Nuklein- bzw. Aminosäuresequenz (SEQ ID Nos:8,9) definiert ist. Die in SEQ ID Nos:8,9 dargestellten Sequenzen scheinen jedoch eine  $\epsilon$ -Cyclase bzw. einen Promotor derselben zu kodieren; eine Sequenzähnlichkeit von SEQ ID Nos:8,9 mit einer im Stand der Technik bekannten Hydroxylase besteht nicht. Somit ist unklar, welches Verfahren in den besagten Ansprüchen geschützt werden soll (Art. 6, PCT).
- 2.2 Weiterhin ist der Gegenstand von Anspruch 15 unklar: Anspruch 15 ist u.a. abhängig von den Ansprüchen 8-14, die sich auf Verfahren zur **Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität** (und/oder  $\beta$ -Cyclase) beziehen. Anspruch 15 bezieht sich jedoch als kennzeichnendes Merkmal in einer Ausführungsform auf eine **reduzierte Aktivität der  $\beta$ -Hydroxylase** (Art. 6, PCT).